

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

**Prüfung eines
halbquantitativen Meßverfahrens
für die Wasseruntersuchung
auf seine Eignung zur Bestimmung
von Kupfer im Serum und Urin**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg**

**vorgelegt von
Björn Schmorell
aus Düsseldorf**

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. V. Becker

Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt

Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.1983

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

A.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
B.	KUPFERSTOFFWECHSEL	1
C.	KUPFERINTOXIKATION	4
	1. Vorkommen von Kupfer	4
	2. Klinik und Diagnostik einer Kupfervergiftung	4
	3. Therapie	8
D.	MORBUS WILSON (HEPATOENTIKULÄRE DEGENERATION)	8
	1. Pathophysiologie	8
	2. Klinik und Diagnostik	9
	3. Therapie	11
E.	AQUAQUANT-FARBMEßSYSTEM FÜR KUPFER	11
	1. Kolorimetrische Analyse-Grundlage des Meßsystems	11
	2. Beschreibung des Meßsystems für Kupfer	12
F.	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	13
	1. Ablauf der Messung	13
	2. Ermittlung der Präzision	17
	2.1. Prüfung in wässrigen Lösungen	17
	2.2. Prüfung für wässrige Lösungen nach Veraschung	20

3. Untersuchung pathologischer Kupferspiegel im Urin	21
3.1. Vorüberlegung und Vorbereitung	21
3.2. Messung von Urinproben mit Werten entsprechend einer Kupferintoxikation	21
3.3. Messung bei Morbus Wilson	23
3.4. Ergebnis	24
4. Untersuchung pathologischer Kupferspiegel im Serum	25
4.1. Vorüberlegung und Vorbereitung	25
4.2. Messung von Serumproben mit Werten entsprechend einer Kupferintoxikation	25
4.3. Ergebnis	27
G. DISKUSSION	28
H. LITERATURVERZEICHNIS	33
I. LEBENSLAUF	38

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Erfassung pathologischer Metallspiegel im Urin oder Blut bleibt bis heute wenigen Kliniken und Instituten vorbehalten, da hierzu kostspielige Apparate wie z. B. Photometer oder Atomabsorptionsspektrographen notwendig sind. Doch auch hier ist oftmals ein hoher Zeitaufwand nötig, da sich Schwermetallvergiftungen in ihrer klinischen Symptomatik oft ähneln und somit, bei fehlender Anamnese, nach einem unbekannten Metall gesucht werden muß. Nach wie vor existiert bis heute noch keine Methode, die schnell und zuverlässig halbquantitativ geringe Mengen eines Schwermetalls im Urin oder Blut nachweist.

Die Firma Merck hat zur Überwachung von Trinkwasser ein halbquantitatives Schnelltestprogramm entwickelt, dessen Empfindlichkeit den behördlich vorgeschriebenen Grenzwerten voll gerecht wird.

Die vorliegende Arbeit soll prüfen, ob auch Kupferspiegel im Blut und Urin hiermit in kurzer Zeit ausreichend genau bestimmt werden können und gegebenenfalls eine klinische Anwendbarkeit im Zusammenhang mit der Diagnostik einer Kupferintoxikation oder eines Morbus Wilson möglich ist.

Zudem gibt die Arbeit eine Übersicht über die Ursachen, Symptomatik, Diagnostik und Therapie einer Kupfervergiftung oder eines Morbus Wilson, weil nur auf diesem Hintergrund Analyseergebnisse richtig beurteilt werden können.

B. KUPFERSTOFFWECHSEL

Kupfer ist für den Menschen ein essentielles Spurenelement mit einem täglichen Bedarf von ca. 1 - 2 mg (BUDECKE, 1977), das in allen Körperorganen vorkommt. Die Ausscheidung des mit der Nahrung zugeführten Kupfers erfolgt in fast gleicher Menge mit den Faeces und nur in geringer Menge mit dem Urin sowie auch in der Milch (BUDECKE, 1977; BUSH, MAHONEY, GUBLER, CARTWRIGHT, WINTROBE, 1955).

Das im oberen Dünndarm (BUDECKE, 1977) resorbierte Kupfer er-

scheint als Cupri-Ion (2-wertig) im Plasma und als Cuproform (1-wertig) in den Erythrozyten (HENSCHLER, 1979). Plasma und Erythrozyten haben jeweils etwa den gleichen Kupfergehalt. 96 % des Plasmakupfers werden in der Leber (CROSS, LESLIE, SMITH, 1976; PSCHYREMBEL, 1975) an Coeruloplasmin gebunden, ein α_2 -Globulin mit einem Kupfergehalt von 0,34 % (BUDDECKE, 1977), 4 % werden an Aminosäuren (Histidin, Threonin) und Glutamin locker assoziiert (BUDDECKE, 1977).

Kupfer ist Bestandteil des Cytochrom a, der Katalase, der Tyrosinase, der Monaminoxidase, der Ascorbinsäure-Oxydase und der Uricase (0,005 %). Es sind auch einige organspezifische Proteine bekannt, in denen Kupfer gebunden ist, so das Hepatocuprein der Leber, das Erythrocuprein der Erythrozyten und des Knochenmarks und das Cerebrocuprein des Zentralnervensystems (BUDDECKE, 1977).

Das Erythrocuprein hat eine Funktion im Hämoglobinstoffwechsel der Erythrozyten (BUDDECKE, 1977), es beeinflusst wahrscheinlich auch die Histaminaktivität (PSCHYREMBEL, 1975).

Kupfer ist außerdem für die Hämoglobinsynthese notwendig, und es fördert die Resorption von Eisen aus dem Intestinaltrakt. Bei Kupfermangel entsteht eine hypochrome mikrozytäre Anämie, die durch Eisengaben unbeeinflusst bleibt (BUDDECKE, 1977).

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die wichtigsten Organkonzentrationen von Kupfer sowie die individuell verschiedenen Kupferkonzentrationen im Blut und Urin.

Tabelle 1: Normalwerte von Kupfer in Organen, Blut und Urin
nach der Literatur

Organ	Bereich (mg Cu/100 g Feuchtgewicht)	Autor
Leber	0,25 - 1,73	BRANDT, 1975
Gehirn, Rinde	0,20 - 1,80	ZOBER et al., 1978
Gehirn, Mark	0,10 - 0,65	ZOBER et al., 1978
Niere	0,12 - 0,31	CARTWRIGHT and WINTROBE, 1964
	Bereich (mg Cu/l)	
Serum	0,81 - 1,47	VOSSCHULTE, LASCH, HEINRICH, 1979
	0,7 - 1,4	PIPER, 1974
	0,8 - 1,4	MERET und HENKIN, 1971
	0,72 - 1,24	HEGLIN, 1972
	1,2	PSCHYREMBEL, 1975
	1,1	CROSS, LESLIE, SMITH, 1976
Urin	0,12	CROSS et al., 1976
	0,01 - 0,1	MERET und HENKIN, 1971

G. KUPFERINTOXIKATION

1. Vorkommen von Kupfer

In der Industrie ist Kupfer in der Vielzahl seiner Verbindungen weit verbreitet:

Metallisches Kupfer und Kupferoxide führen bei Inhalation wegen der geringen Löslichkeit des Kupfers nur selten zu Vergiftungen (MOESCHLIN, 1980). Bei hohen Dosen wie z. B. beim Lichtbogenschweißen kann es jedoch zu Intoxikationen kommen (LUDEWIG, LOHS, 1974).

Kupferhydroxid ist Bestandteil von Schiffsbodenfarben, im Gemisch von Kupferkarbonat dient es der Herstellung von Farbpigmenten, Glasuren und Beizen (LUDEWIG, LOHS, 1974).

Kupferoxychlorid ist in vielen Fungiziden, oft auch in Kombination mit Insektiziden, enthalten (LUDEWIG, LOHS, 1974).

Kupferazetate sind in milden Ätzmitteln bzw. Adstringentien, Beizen, Farben und Anti-Fouling-Präparaten enthalten (LUDEWIG, LOHS, 1974).

Kupfersulfat wird zur Herstellung von Mineralfarben, Schädlingsbekämpfungsmitteln und Holzkonservierungsstoffen verwendet, in der Medizin wirkt es 0,1 - 2 %ig als Adstringens, Emetikum (1 %ig) und Ätzmittel, im Labor ist es Bestandteil der Fehling'schen Lösung (LUDEWIG, LOHS, 1974).

2. Klinik und Diagnostik einer Kupfervergiftung

Nach Inhalation von feinstverteiltem Kupfer als Staub oder Rauch in höheren Konzentrationen entwickeln sich klinische Erscheinungen, die als Metallfieber bezeichnet werden (MOESCHLIN, 1980) und ebenso durch Zink, Magnesium, Aluminium, Antimon, Eisen, Mangan, Nickel, Selen, Silber und Zinn zustande kommen können (HENSCHLER, 1979). - Charakteristische Initialsymptome sind bei der Kupferinhalation ein süßlicher Geschmack, Trockenheitsgefühl im Rachen und starkes Augenbrennen (MOESCHLIN, 1980). Einige Stunden nach der Inhalation tritt dann Fieber mit starken Kopf-

schmerzen, allgemeiner Abgeschlagenheit und katarrhalischen Beschwerden auf. Es besteht eine Leukozytose, der Serumkupfergehalt ist erhöht und im Urin wird vermehrt Kupfer ausgeschieden. Gewöhnlich normalisiert sich die Körpertemperatur schon innerhalb von 24 Stunden nach Expositionsende, spätestens am 2. Tage, und die Fieberzustände klingen, ohne Schäden zu hinterlassen, wieder ab (MOESCHLIN, 1980).

Als Ursache des Fiebers wird eine Entstehung von Eiweißabbau- oder Komplexverbindungen im Atemtrakt vermutet, die dann pyrogen wirken (VALLEE, 1975).

Nach längerer Exposition können auch durch Einatmen von Kupferstaub Schleimhautulcerationen im Bereich der Nase, bis zur Perforation des Septums auftreten (HENSCHLER, 1979). Kupferstäube können weiterhin Brechreiz, Magenschmerzen und Diarrhoen verursachen (HENSCHLER, 1979).

In einer Untersuchung in einem Kupferbetrieb wiesen 13 von 17 Kupferexponierten ein typisches Kupferfieber auf und 8 Arbeiter während des Fiebers einen erhöhten Serumkupferspiegel (mehr als 1,6 mg/l) (MOESCHLIN, 1980).

Eine chronische Kupfervergiftung gilt als nicht gesichert. CROSS, LESLIE und SMITH (1976) berichten in einer Studie von 5 Arbeitern, die 6 Jahre lang kupferexponiert (in Form von Staub) waren und dabei folgende Kupferkonzentrationen im Urin aufwiesen:

0,11 mg/ l

0,24 mg/ l

1,12 mg/ l

5,84 mg/ l

8,82 mg/ l,

d. h. die Werte waren teilweise normal, verdächtig auf Morbus Wilson oder wiesen sogar auf eine akute Kupferintoxikation hin (siehe Tabelle 1, 2, 3). Differentialdiagnostisch stellt dies jedoch kein Problem dar (siehe folgende Kapitel).

Die Arbeiter zeigten grüne Verfärbungen der Finger- und Fußnägel,

sowie grün-schwärzliche Verfärbungen der Haut und des Kopfhaares, aber keinerlei Vergiftungserscheinungen.

- Für Kupferstäube wurden dennoch aus Sicherheitsgründen maximale Arbeitsplatz-Konzentrationen festgelegt:

für Rauch:	0,1 mg/m ³	Luft	(HENSCHLER, 1981;
für Staub:	1,0 mg/m ³	Luft	MAK-Werte)

Kupfersulfat hat im Gegensatz zu Kupferstäuben eine sehr hohe Toxizität. Akute Kupfervergiftungen mit Kupfersulfat sind jedoch sehr selten, lediglich in Indien führen Kupfersalze, die in suicidalen Absicht genommen werden, die Intoxikationsstatistiken mit 30 % an (CHUTTANI et al., 1965).

Schon nach 1 g peroral eingenommen, treten Vergiftungserscheinungen wie Erbrechen und Durchfall auf. Die tödliche Dosis ist, da sofort schweres Erbrechen ausgelöst wird, nur schwer zu bestimmen (MOESCHLIN, 1980). Sie liegt bei ca. 8 g (LUDEWIG, LOHS, 1974) bzw. 10 g (MOESCHLIN, 1980).

Schwere Vergiftungserscheinungen beginnen mit häufigem Erbrechen blaugrüner Massen, begleitet von schweren wässrigen blutig durchsetzten Durchfällen. Gewöhnlich ist das Krankheitsbild so schwer, daß die Patienten bereits im ersten schweren Kollapsstadium 2-3 Stunden nach der Giftaufnahme sterben (MOESCHLIN, 1980). Wird dieses überstanden, so kommt es nachher durch Resorption des Kupfersulfats innerhalb von 5-6 Stunden zu einer schweren Hämolyse mit Hämoglobinurie, Anämie und später zu einem hämolytischen Ikterus sowie eventuell zu einer tubulären Nierenschädigung (EDER, GEDIGK, 1977).

In der Literatur ist auch ein Fall einer Kupfervergiftung durch Spülen einer tuberkulösen Fistel bei einem 6-jährigen Jungen mit 9 ml einer 10 %igen CuSO₄-Lösung beschrieben worden (JOEST, 1937). Auch sollen Vergiftungserscheinungen durch Auftragen von CuSO₄-haltigen Salben oder Lösungen auf eine vorgeschädigte Haut verursacht werden (HOLTZMANN, 1966).

Bei einer Kupfervergiftung kommt es pathologisch-anatomisch zu einer charakteristischen Blaufärbung der Schleimhäute des Di-

gestionstraktes und einer toxischen Verfettung der parenchymatösen Organe. Das aufgenommene Kupfer wird dabei in der Leber nahezu vollständig resorbiert (JOEST, 1937).

Im Blut und Urin kommt es zu folgenden, in Tabelle 2 zusammengestellten Kupferspiegeln:

Tabelle 2: Kupferkonzentrationen im Blut und Urin bei einer akuten Kupferintoxikation

	Bereich (Cu mg/l)	Autor
Urin	1,5 1,0 - 2,0 65,7	CROSS et al., 1976 FAZEKAS, 1954 GRUSZ-HARDAY, 1969
Serum	2,5 3,0 - 6,0 3,0 - 6,0 9,0 8,7 - 23,5	ZOBER et al., 1978 KLEIN et al., 1972 CHUTTANI et al., 1965 GELDMACHER - v. MALLINCKRODT et al., 1969 GRUSZ-HARDAY, 1969
Vollblut	5,5 g/g Trockengewicht über 10 g/g Trockengewicht	CROSS et al., 1976 HOLTZMANN, 1966

Es sei vollständigshalber darauf hingewiesen, daß bei Infektionen, Glomerulonephritis, Myokardinfarkt, Thyreotoxikose, Eisenmangelanämie, Tumoren, Gravidität und Gabe von Oestrogenen der Serumkupferspiegel ebenfalls erhöht sein kann (BUDDECKE, 1977).

3. Therapie

Liegt eine akute Kupfersalzvergiftung vor, so ist eine rasche und gezielte Therapie notwendig, die im folgenden stichpunktartig zusammengestellt ist (aus MOESCHLIN, 1980).

- 1) Kaliumferrocyanid: sofortiges Einflößen von 0,6 g in Wasser, wodurch ein unlösliches Kupfersalz entsteht;
- 2) Milch mit Eiereiweiß führt das Kupfer in ein Caseinat und Albuminat über, die anschließend durch Magenspülen oder Erbrechen wieder entfernt werden müssen;
- 3) BAL-Therapie (= Dimercaprol), $\text{CaNa}_2\text{-EDTA}$ (Ionenaustauscher, Cu gegen Ca), D-Penicillamin;
- 4) Infusionen mit 5 % Laevulose, Bluttransfusionen;
- 5) Schockbehandlung, Corticosteroidtherapie;
- 6) bei Niereninsuffizienz (Hämolyse!) Hämodialyse.

D. MORBUS WILSON (HEPATOLENTIKULÄRE DEGENERATION)

1. Pathophysiologie

Der Morbus Wilson ist eine seltene, autosomal-rezessive Erbkrankheit. Betroffen hierbei ist der Kupferstoffwechsel. Charakteristisch ist eine extreme Kupferspeicherung in den Geweben, besonders in der Leber, Nieren, Gehirn und Kornea (VOSSCHULTE et al., 1979) sowie eine gesteigerte enterale Kupferresorption (PSCHYREMBEL, 1975).

Das Coeruloplasmin, an das ja das Kupfer im Serum zu 96 % gebunden wird, ist erniedrigt. Dadurch wird das Kupfer mehr an Albumin gebunden, wegen der leichten Dissoziation aber auch vermehrt in den Nieren gefiltert und ausgeschieden. Die Pathogenese der Kupferspeicherung konnte bisher nicht ausreichend geklärt werden (BUDDECKE, 1977; VOSSCHULTE et al., 1979).

2. Klinik und Diagnostik

Das klinische Manifestationsalter wird in der Literatur unterschiedlich angegeben:

- 6 - 20 Jahre (VOSSCHULTE et al., 1979),
- 10 - 30 Jahre (PSCHYREMBEL, 1975),
- 20 - 40 Jahre (PIPER, 1974).

Vor der Pubertät treten, bedingt durch die exzessiven Kupferablagerungen in der Leber (SCHEUER, 1974; BRANDT, 1974) gewöhnlich nur die Lebermanifestationen in Erscheinung (PSCHYREMBEL, 1975). Aber auch unabhängig vom Alter sind dies die ersten Krankheitszeichen (VOSSCHULTE et al., 1979). Das Krankheitsbild ähnelt einer chronisch aktiven Hepatitis mit zunehmender Leberinsuffizienz (Ikterus, Hepatosplenomegalie, Aszites, Panzytopenie, Spider naevi etc.). Unbehandelt kommt es entweder zum Tod durch Leberkoma oder Ösophagusvarizenblutungen (VOSSCHULTE et al., 1979).

Nach der Pubertät (PSCHYREMBEL, 1975) bzw. nach den hepatischen Symptomen (VOSSCHULTE et al., 1979; PIPER, 1974, beschrieb es umgekehrt) tritt folgende neurologische Symptomatik in den Vordergrund, bedingt durch degenerative Veränderungen im Bereich des Corpus striatum (Linsenkerne), Cortex, Hypothalamus und Cerebellum (EDER, GEDIGK, 1977; LEU et al., 1971; REED et al., 1972; WINKLER, 1963):

Extrapyramidale Bewegungsstörungen, wie akinetisch rigides Parkinson-Syndrom, auch choreatische, athetotische und dystonische Hyperkinesen, Sprach- und Schreibstörungen. Im Laufe der Jahre treten die extrapyramidalen Bewegungsstörungen in den Hintergrund, und es entwickeln sich zerebellare Bewegungsstörungen (GROSS, SCHÖLMERICH, 1977).

Erwähnt sei auch der psychische Abbau mit zunehmender Hilflosigkeit, jedoch relativ spät einsetzendem Intelligenzverlust (HORNBOSTEL, KAUFMANN, SIEGENTHALER, 1978).

Pathognomonisch bei einer neurologischen Manifestation ist immer der sogenannte Kayser-Fleischer-Ring, ein rostbrauner Pigmentring an der Peripherie der Kornea. Eine Untersuchung mit der Spaltlampe erlaubt hierbei die Früherkennung (VOSSCHULTE et al., 1979; PIPER, 1974).

Zum Krankheitsbild des Morbus Wilson gehört nicht selten eine

Nierenfunktionsstörung mit einem proximal tubulären Defekt, der zum Fanconi-Syndrom führt mit Aminoacidurie, Glucosurie, Proteinurie und Phosphaturie. Knochenveränderungen im Sinne einer Osteomalazie können dann durch die Phosphatverluste bedingt sein (VOSSSCHULTE et al., 1979).

Die Prognose und der Verlauf des Morbus Wilson ist recht unterschiedlich. Kommt es zu einer schweren Lebermanifestation, beträgt unbehandelt die Letalität ca. 50 %. Das neurologische Krankheitsbild verläuft sehr progredient, bis zur Kachexie mit Muskelschwund, begleitet von Kontrakturen (VOSSSCHULTE et al., 1979).

Die Krankheitsdauer beträgt wenige Monate bis 3 - 4 Jahrzehnte (GROSS, SCHÜLMERICH, 1977). - Liegt eine entsprechende Symptomatologie vor, so kann die Diagnose mit bestimmten Laborwerten gesichert werden, die in der folgenden Tabelle zusammengestellt sind:

Tabelle 3: Charakteristische Laborwerte bei Morbus Wilson

	Bereich (Cu mg/l)	Autor
Serum	unter 0,8	VOSSSCHULTE et al., 1979 SCHETTLER, 1980
Urin	1 - 3	GROSS et al., 1976
Serumcoeruloplasminspiegel	weniger als 200 mg/l	VOSSSCHULTE et al., 1979

Dabei gilt es jedoch zu bedenken, daß niedrige Serumkupferwerte auch bei Eiweißmangel (Sprue und nephrotisches Syndrom) vorkommen, also allein nicht beweisend für einen Morbus Wilson sind (VOSSSCHULTE et al., 1979).

Im Frühstadium der Krankheit entsteht oft eine Coombs-negative Anämie, die in schweren hämolytischen Krisen verläuft, die mit der Zeit besser werden und schließlich ganz aufhören (VOSSSCHULTE et al., 1979).

3. Therapie

Die Therapie des Morbus Wilson zeigt gute Erfolge. Das Kupfer wird aus den Geweben mobilisiert, damit es erhöht ausgeschieden werden kann, um so die schädigenden Kupferspeicher zu beseitigen. Dies wird durch kupferbindende Substanzen wie D-Penicillamin, Trolovol und Metalcaptase erreicht. Bei D-Penicillamin gibt man zu Beginn der Therapie 2000 mg, die Erhaltungsdosis beträgt 900 - 1000 mg täglich. Das gebundene Kupfer wird dann mit dem Urin ausgeschieden (VOSSSCHULTE et al., 1979, MOESCHLIN, 1980). Sensibilisierungserscheinungen mit Fieber kommen häufig vor, sie werden in der Dauertherapie mit 500 mg D-Penicillamin plus Prednison 15 - 20 mg täglich behandelt (MOESCHLIN, 1980).

E. AQUAQUANT-FARBMEßSYSTEM FÜR KUPFER

1. Kolorimetrische Analyse-Grundlage des Meßsystems

Das vorliegende Meßsystem beruht auf der vergleichenden Kolorimetrie. Dies ist ein Verfahren zur Bestimmung einer Farbblösung aufgrund ihrer Farbtintensität. Verglichen wird dabei die Farbtiefe einer farbigen Lösung von gesuchter Konzentration mit einer Vergleichslösung bekannter Konzentration (LANGE, 1952). Bei einer hohen Verdünnung der Prüflösung hängt die Farbtintensität dann von der Konzentration des zu bestimmenden Stoffes ab, wenn im Überschuß ein bestimmtes, farbreaktives Reagenz hinzugegeben wird.

Bereits Mitte des vorigen Jahrhunderts wurden Farbton- und Intensitätsmeßgeräte entwickelt, auch optische Komparatoren genannt, die sich dieses Prinzip zunutze machten. Diese Geräte

hatten jedoch gegenüber den in den 40iger Jahren eingeführten lichtelektrischen Photometern den Nachteil eines hohen Aufwandes an Zeit, Glasgeräten und Fachkräften sowie auch Kosten, die so viel wie ein einfaches Photometer betragen konnten.

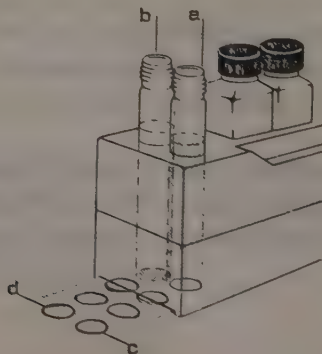
Die Firma Merck hat die oben beschriebene klassische Kolorimetrie für eine Reihe von chemischen Elementen so weiterentwickelt, daß sie ein einfaches und preiswertes Schnelltestprogramm zur Wasseranalyse erstellen konnte.

Das vorgestellte Verfahren für Kupfer beruht auf der Messung eines blauen Farbkomplexes, den das sehr empfindliche und selektive Reagenz Cuprizon (s. S. 13) mit Kupfer bildet.

2. Beschreibung des Meßsystems für Kupfer

Die Meßapparatur besteht aus einem rechteckigen Styroporblock, der in einem verschließbaren Kunststoffbehälter steht. In dem Styroporblock sind Aussparungen, in denen die Reagenzien, ein Meßlöffel und am linken Rand 2 Glasrohre ('unteres' = a, 'oberes' = b, siehe Skizze 1) enthalten sind. Längs in dem Kunststoffkasten ist noch eine Farb- und Meßskala untergebracht, die auseinandergeklappt auf der linken Seite 2 Reihen von jeweils 10 Farbkreisen besitzt und auf der rechten Seite 10 Meßwertmarkierungen. Die unteren Farbkreise (c) haben alle den gleichen Gelbton, die oberen (d) variieren von gelb über verschiedene Blautöne bis dunkelblau. Diese Farb- und Meßskala wird durch eine Aussparung rechts im Gehäuse unter den Styroporblock geschoben, so daß die Farbkreise genau unter den Glasrohren zu liegen kommen (siehe Abb. 1).

Abb. 1:



F. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

1. Ablauf der Messung

Die beiden Glasrohre werden mit dem zu untersuchenden Wasser bis zu einem markierten Füllstand von 80 mm (je 20 ml) aufgefüllt. Das dem Betrachter zugewandte Glasrohr (a) wird nun mit Reagenzien versetzt. Zunächst wird ein Maskierungsmittel-Puffer-Gemisch hinzugegeben und gelöst, dann das Reagenz Cuprizon, Oxalsäure-bis-(cyclo-hexylidenhydrazid), das einen blauen Farbkomplex mit Kupfer bildet. Die entstehende blaue Färbung ist proportional zur Konzentration des zu bestimmenden Kupfers. Wird dieses Glasrohr auf eine gelbe Fläche gestellt (unteren Farbkreise), so ergibt sich von oben gesehen ein durch interne Reflexion verstärkter brillanter Farbeindruck, der beim Blindprobenrohr (b) durch Unterlegen eines entsprechenden Farbkreises (d) simuliert wird. Die Farbskala wird beim Meßvorgang von rechts nach links geschoben. 3 Minuten nach Reagenzienzusatz erfolgt der Farbvergleich. Stimmen zwei Farbtöne überein, so wird der Meßwert an der rechten Gehäusekante abgelesen.

Die gelbe Gegenskala konnte aus folgenden Gründen nicht weiß gehalten werden (Information der Firma MERCK):

Im oberen Meßbereich kann ab einer bestimmten Farbintensität diese unter dem Vergleichsrohr nicht mehr durch Druckfarben simuliert werden. Sie hätten einen zu hohen Grauanteil und wären kraftlos. Daher wird die Farbreihe mit einer Gelbmaske versehen, d. h. die dem Glas mit der Untersuchungslösung unterlegte Grundfarbe ist gelb. Die Blautöne werden dadurch zwar verfälscht, aber sie lassen sich jetzt durch Druckfarben unter dem Vergleichsrohr simulieren. Der Meßumfang nach oben wird durch diesen Kunstgriff erweitert und zeigt folgende Unterteilung:

0	0,05	0,07	1,0	1,2	1,5	2,0	2,5	3,0	4,0	Cu mg/l
---	------	------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------------

Die beiliegende Gebrauchsanleitung gibt folgende Hinweise für den Meßvorgang:

Art. 14414

Aquaquant

Bestimmung von Kupfer

Bereich: 0,05 - 0,4 mg/l (ppm) $\boxed{0,8 - 6,3 \text{ mmol/m}^3}$

Funktion: Komparatorblock so auf ebene Fläche stellen, daß Gläser links angeordnet sind. Beide Gläser mit Wasserprobe füllen. Die Reagenzien nun in das dem Prüfer zugewandte innere Glas geben. Farbtafel von rechts in Aussparung am Boden des Blockes einschieben bis die mit Reagenz versetzte Probe mit der Farbfläche unter Blindprobe übereinstimmt. Meßwert an rechter Blockkante ablesen.

Farbreaktion: Maskierungsmittel-Puffer-Gemisch Cu - 1 A verhindert störende Gelbfärbungen, die bei Pufferung auf pH 8,2 in eisenhaltigen Wässern auftreten können. Anschließend reagiert das weitgehend selektive Reagenz Cuprizon (Cu - 2 A) $\boxed{\text{Oxalsäure-bis-(cyclo-hexylidenhydrazid)}}$ unter Bildung eines blauen Farbkomplexes, der bei Wassertemperaturen von nicht über 30° gemessen wird.

- a) Beide Gläser bis zur Maskierung mit Wasserprobe füllen.
- b) Inneres Glas mit 1 Löffel (grün) Cu - 1 A versetzen, lösen.
- c) Inneres Glas mit 3 Tropfen Cu - 2 A versetzen, mischen.
- d) Farbabgleich nach 3 min.

Die Gebrauchsanleitung enthält außerdem noch Informationen über mögliche Störionen, die in Tabelle 4 zusammengestellt sind.

Tabelle 4: Aufstellung von Störionen

Cu mg/l			
0			
+ Ion mg/l	5	50	500
Folgende Konzentrationen verursachen keine Störungen	Co ²⁺ , Cr ³⁺	As ³⁺	Ag ⁺ , Al ³⁺ , Ba ²⁺
	Cr ⁶⁺ , Fe ²⁺	Ca ³⁺	Be ²⁺ , Bi ³⁺ , Ce ²⁺
	Fe ³⁺ , Hg ⁺	Sb ³⁺	Cd ²⁺ , Hg ²⁺ , K ⁺
	Ni ²⁺ , U ⁶⁺		La ³⁺ , Li ⁺ , Mg ²⁺
	V ⁵⁺		Mn ²⁺ , Mo ⁵⁺ , Mo ⁶⁺
			NH ₄ ⁺ , Na ⁺ , Pb ²⁺
			Rb ⁺ , Se ⁴⁺ , Sn ²⁺
			Sr ²⁺ , Te ⁴⁺ , Th ⁴⁺
			Ti ⁴⁺ , Tl ⁺ , W ⁶⁺
			Zn ²⁺ , Zr ⁴⁺
			Acetat, Ascorbat
			B ₄ C ₇ ²⁻ , Br ⁻ , BrO ₃ ⁻
			CN ⁻ , CO ₃ ²⁻ , Citrat
			Cl ⁻ , ClO ₃ ⁻ , ClO ₄ ⁻
			F ⁻ , J ⁻ , JO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻
			NO ₃ ⁻ , OCN ⁻ , Oxalat
			PO ₄ ³⁻ , S ²⁻ , SCN ⁻
			SO ₃ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻
			SO ₄ ²⁻ , S ₂ O ₈ ²⁻
			Si ₃ ²⁻ , Tartarat

Tabelle 4 - Fortsetzung

Cu mg/l		0,4			
+ Ion mg/l	0,5	5	50	500	Na ⁺ X ⁻
Folgende Kon- zentrationen verursachen keine Störungen	As ³⁺	Ce ³⁺ , Cr ³⁺	Be ²⁺ , Bi ³⁺	Ag ⁺ , Al ³⁺ , Ba ²⁺	NaCl 1,5 g
	Sb ³⁺	Ca ⁶⁺ , Fe ²⁺	Co ²⁺ , Fe ³⁺	Ca ²⁺ , Cd ²⁺ , Hg ²⁺	NaNO ₃ 3,0 g
		Hg ⁺ , Sn ²⁺	Mo ⁵⁺ , Ni ²⁺	K ⁺ , La ³⁺ , Li ⁺	Na ₂ SO ₄ 0,7 g
		U ⁶⁺	Te ⁴⁺ , V ⁵⁺	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Mo ⁶⁺	Na ₂ B ₄ O ₇
				NH ₄ ⁺ , Na ⁺ , Pb ²⁺	10 H ₂ O 0,5 g
				Rb ⁺ , Se ⁴⁺ , Sr ²⁺	Titriplex III
				Th ⁴⁺ , Ti ⁴⁺ , Tl ⁺	0,0 mg
				W ⁶⁺ , Zn ²⁺ , Zr ⁴⁺	
		Ascorbat		Acetat, B ₄ O ₇ ²⁻	
		CN ⁻ , S ₂ O ₈ ²⁻		Br ⁻ , BrO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻	
				Citrat, Cl ⁻	
				ClO ₃ ⁻ , ClO ₄ ⁻	
				F ⁻ , J ⁻ , JO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻	
				NO ₃ ⁻ , OCN ⁻	
				Oxalat, PO ₄ ³⁻	
				S ²⁻ , SCN ⁻ , SO ₃ ²⁻	
				S ₂ O ₃ ²⁻ , SO ₄ ²⁻	
				SiO ₃ ²⁻ , Tartrat	

2. Ermittlung der Präzision

2.1. Prüfung in wässrigen Lösungen

Um die angegebenen meßbaren Konzentrationswerte überprüfen zu können, waren Lösungen erforderlich, die eine jeweils definierte Menge Kupfer enthielten. Da Testlösungen nicht vorhanden waren, war die Herstellung einer Stammlösung notwendig. Die maximal meßbare Konzentration betrug 0,4 mg Cu/l, demnach mußte die Stammlösung eben diese Menge Kupfer enthalten, um dann durch entsprechendes Verdünnen die anderen niedrigeren Konzentrationen zu erhalten.

Zur Verfügung stand Kupferchlorid (CuCl_2) $\cdot$ 2 H_2O , ein türkisfarbenes Salz mit einem Molekulargewicht von 170,48 und einem Kupferanteil dieser Verbindung von 37,27 %. Für einen Liter Stammlösung (Aqua destillata) mußten also 1,0732 mg CuCl_2 eingewogen werden, um eine Konzentration von 0,4 mg Cu/l zu erreichen. Für eine praktikable Verdünnungsreihe, auch unter dem Gesichtspunkt der Einwiegegenauigkeit, wurden jedoch 107,32 mg CuCl_2 eingewogen. Damit war erreicht, daß jede gewünschte Konzentration von 0,05 - 0,4 mg Cu/l hergestellt werden konnte, indem man eine vorher berechnete Menge Stammlösung in einen 100 ml Meßkolben pipettierte und dann genau auf 100 ml auffüllte. Für die im Meßsystem angegebenen Ablesemarken ergaben sich folgende Mengen:

Cu mg/l	0,05	0,07	0,1	0,12	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4
ml CuCl_2 Stamm- lösung	0,125	0,175	0,25	0,3	0,375	0,5	0,625	0,75	1

Vor den Messungen wurde der Leerwert bestimmt, d. h. nur das deionisierte Wasser ohne Zusätze wurde gemessen. Er ergab 0,15 mg Cu/l. Daraus wurde zunächst geschlossen, daß das verwendete deionisierte Wasser zuviel Kupfer enthielt. Nach Verwendung von Aqua-bi-dest. (zweifach destilliertes Wasser) bestätigte sich diese Vermutung.

Der Leerwert betrug jetzt eindeutig 0.

Die nun anschließenden Messungen ergaben folgende Werte (Tabelle 5):

Tabelle 5: Messung von Kupferkonzentrationen in wässrigen Lösungen

ml Stamm- lösung	0,125	0,175	0,25	0,3	0,375	0,5	0,625	0,75	1
Cu mg/l erwarte- ter Wert	0,05	0,07	0,1	0,12	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4
Cu mg/l abgelese- ner Wert									
1. Meß- reihe	0,05	0,07	0,1	0,12	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4
2. Meß- reihe	0,05	0,07	0,1	0,12	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4
3. Meß- reihe	0,05	0,07	0,1	0,12	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4
4. Meß- reihe	0,05	0,07	0,1	0,12	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4
5. Meß- reihe	0,05	0,07	0,1	0,12	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4

Wie die Tabelle zeigt, stimmen in allen Fällen die berechneten Kupferkonzentrationen mit den gemessenen überein. Diese Präzision war natürlich erst nach einer gewissen Übung mit den Gerätschaften, vor allem aber durch sorgfältiges Pipettieren möglich. Bei der Durchführung mußte beachtet werden, daß das Maskierungsmittel-Puffer-Gemisch sich gut löste (kräftig schütteln), da sonst die Kristalle auf den Boden des Glasrohres sanken und die Ablesegenauigkeit beeinträchtigten. -

Es wurden auch Messungen ohne Puffer durchgeführt, die den Einfluß des Puffergemisches auf die Reaktionsgeschwindigkeit und die Ablesegenauigkeit zeigen sollten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt:

Tabelle 6: Messung von Kupferkonzentrationen in wässrigen Lösungen ohne Maskierungsmittel-Puffer-Gemisch

Cu mg/l erwarteter Wert	0,05	0,07	0,1	0,12	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4
Cu mg/l abgelesener Wert									
1. Meßreihe	0,05	0,05	0,07	0,1	0,12	0,15	0,2	0,25	0,3
2. Meßreihe	0,05	0,07	0,07	0,1	0,15	0,15	0,2	0,3	0,3
3. Meßreihe	0,05	0,05	0,1	0,1	0,12	0,15	0,2	0,25	0,3

Die Meßergebnisse ohne Puffergemisch von Tabelle 6 zeigen, daß die Ablesewerte Überwiegend um einen Wert zu niedrig anzeigten. Außerdem dauerte die Farbreaktion wesentlich länger, hier wurde teilweise die 3-Minuten-Grenze überschritten. Die Messungen mit Puffer erbrachten oft schon nach einer Minute den endgültigen Farb- bzw. Meßwert, der sich bis zu 20 Minuten nicht veränderte.

Es wurde auch eine Untersuchung durchgeführt, die Aufschluß darüber geben sollte, ob neben den vorgesehenen Ablesemarken mit ihren zugehörigen Farbtönen weitere, sichere Ablesewerte auf der Skala unterzubringen wären. Dabei wurden Konzentrationen hergestellt, die zwischen den vorgegebenen, meßbaren lagen. Es zeigte

sich jedoch, daß nicht immer zu diesen Konzentrationen auch Zwischenfarben zuzuordnen waren. So hatte z. B. der Zwischenwert von 0,35 nicht immer eine eindeutig von 0,3 oder 0,4 verschiedene Farbe. Oft war der Farbwert entweder 0,3 oder 0,4 zuzuordnen. Zwischenfarben, auch zwischen anderen Ablesemarken, waren nach einer Reihe von Untersuchungen nie eindeutig reproduzierbar und eine Gesetzmäßigkeit hierüber konnte nicht gefunden werden.

2.2. Prüfung für wässrige Lösungen nach Veraschung

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob das für spätere Versuche notwendige Naßveraschen Störeinflüsse durch Ionen verursacht und damit die Genauigkeit der Messung beeinträchtigt. Die Naßveraschung wurde auf folgende Weise durchgeführt:

Zu ca. 10 ml einer Untersuchungslösung wurden ca. 5 ml konzentrierte Salpetersäure und ca. 10 ml konzentrierte Schwefelsäure gegeben. Anschließend wurde die Untersuchungslösung in einem Sandbad stark erhitzt, wobei sie langsam verdampft. Sobald die Lösung dunkel wurde, mußte tropfenweise HNO_3 hinzugegeben werden, bis die Lösung wieder klar war. Bei endgültigem Klarbleiben wurde sie zur Trockne gebracht.

Es zeigte sich später beim Veraschen von Urin und Serum, daß unter diesen Bedingungen ein störender gelblich bis braun-schwarzer Veraschungsrückstand übrigblieb. Mit konzentrierter Perchlorsäure als starkes Oxidationsmittel (tropfenweise) konnte dann ein weißer Veraschungsrückstand erzielt werden. Das Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid (H_2O_2) war dazu völlig ungeeignet, weil es keine sichtbare Farbschwächung erreichte.

So wurde auch beim Veraschen wässriger Lösungen Perchlorsäure benutzt, um vergleichbare Versuchsbedingungen herzustellen. Der Veraschungsrückstand wurde mit Aqua-bi-dest gelöst und anschließend der pH-Wert der Lösungen (ca. 1,7 - 2,2) mit konzentrierter NaOH auf einen Wert von 7 - 8 eingestellt. In einem Bereich von 6,5 - 9,0 konnten überwiegend genaue Messungen realisiert werden.

Im Sinne einer einheitlichen Versuchsdurchführung und exakten Messung sind alle Versuche bei einem pH-Wert von 8 durchgeführt worden. Die so durchgeführten 5 Meßreihen erbrachten die gleichen Ergebnisse wie die in Tabelle 5 wiedergegebenen.

3. Untersuchung pathologischer Kupferspiegel im Urin

3.1. Vorüberlegung und Vorbereitung

Da mit dem vorliegenden Meßsystem nur farblose Lösungen gemessen werden können, mußte die Gelbfärbung des Urins beseitigt werden. Das bedeutet, daß die organische Matrix zerstört werden muß, um so den anorganischen Bestandteil des Urins meßbar zu machen. Dies konnte mittels oben beschriebener Veraschung erreicht werden. In Vorversuchen wurde wie bei der Messung von veraschten wässrigen Lösungen vorgegangen. Es zeigte sich jedoch, daß der Veraschungsrückstand von Urin in Aqua-bi-dest nicht vollständig lösbar war. Die Lösung wurde leicht milchig trüb und machte eine Farbdifferenzierung unmöglich. Durch kurzes Aufkochen des Veraschungsrückstandes mit Aqua-bi-dest war es dann jedoch in allen Fällen möglich, eine einwandfrei klare, farblose und damit meßbare Lösung zu bekommen.

3.2. Messung von Urinproben mit Werten entsprechend einer Kupferintoxikation

Da keine Urine von Patienten mit einer Kupfervergiftung zur Verfügung standen, wurde normaler Urin genommen und durch Zugabe von Stammlösung Konzentrationen wie bei den wässrigen Lösungen von 0,05 - 0,4 mg Cu/l simuliert. Dies entspricht zwar nicht dem Bereich von Konzentrationen einer Kupfervergiftung (1 - 65 mg Cu/l), doch müßte bei einer Urinprobe mit einem unbekannten Kupfergehalt in jedem Falle schrittweise bis in den Meßbereich hinein herunterverdünnt werden. Es sollte hier geprüft werden, ob das Meßsystem überhaupt bei veraschten Urinen verwendbar ist und wenn ja, wie genau die Messung erfolgen kann.

Es wurde folgendermaßen vorgegangen:

- a) Veraschen von 10 ml Probelösung (Urin + Stammlösung);
- b) Aufkochen mit Aqua-bi-dest;
- c) Einstellen auf pH-Wert von 8 mit konzentrierter NaOH;
- d) Auffüllen auf 100 ml mit Aqua-bi-dest;
- e) Messen.

Zunächst wurde der Kupfergehalt des untersuchten Urins bestimmt. Der Farbvergleich ergab auf der Skala den Wert 0. Mit Hilfe eines Polarographen konnte das Ergebnis bestätigt werden, da der exakt bestimmte Wert mit 0,014 Cu mg/l weit unterhalb vom Meßbereich des Aquaquant Meßsystems lag.

In der Tabelle 7 sind die Ergebnisse von insgesamt 4 Meßreihen zusammengestellt:

Tabelle 7: Messung von Kupferkonzentrationen im Urin mit Kupferzusatz nach Veraschung

Cu mg/l erwarteter Wert	0,05	0,07	0,1	0,12	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4
Cu mg/l abgelesener Wert									
1. Meßreihe	0,05	0,05	0,07	0,1	0,12	0,15	0,2	0,25	0,4
2. Meßreihe	0,05	0,05	0,07	0,1	0,12	0,15	0,2	0,25	0,4
3. Meßreihe	0,05	0,07	0,1	0,12	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4
4. Meßreihe	0,05	0,07	0,1	0,12	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4

Man erkennt, daß in den Meßreihen 1 und 2 offensichtlich ein systematischer Fehler vorliegt. Der abgelesene Wert liegt immer um

einen tiefer als der erwartete, so z. B. 0,07 statt 0,1 und 0,1 statt 0,12 mg Cu/l. Die genaue Ursache dafür konnte jedoch nicht ermittelt werden. Möglicherweise war der Fehler durch Störionen bei der Veraschung verursacht, da bei den Kontrollmessungen 3 und 4 das tropfenweise Hinzugeben von HNO_3 und Perchlorsäure vorsichtiger vorgenommen wurde, (d. h. geringerer Verbrauch an Säure, damit weniger Störionen). Hier stimmten alle Werte exakt überein.

3.3. Messung bei Morbus Wilson

Es standen 5 Urinproben einer Patientin zur Verfügung, die an Morbus Wilson erkrankt war. Da die Meßwerte in einem Bereich von 1 - 3 mg Cu/l (siehe Seite 10) zu erwarten waren, wurden je 10 ml Urin verascht und der Veraschungsrückstand auf 100 ml mit Aqua-bi-dest aufgefüllt (Verdünnung 1 : 10). Die Messungen wurden über eine vergleichende polarographische Cu-Bestimmung kontrolliert und ergaben folgende, in Tabelle 8 zusammengestellten Werte:

Tabelle 8: Messung von Kupferkonzentrationen im Urin bei einer Morbus Wilson Patientin

Probeurin Nr.	1	2	3	4	5
1. Meßreihe					
Cu mg/l (abgelesener Wert)	0,15	0,12	0,15	0,15	0,1
umgerechnet auf Urinkonzentration (abgelesener Wert x 10)	1,5	1,2	1,5	1,5	1,0
2. Meßreihe					
Cu mg/l (abgelesener Wert)	0,15	0,12	0,15	0,15	0,1
umgerechnet auf Urinkonzentration (abgelesener Wert x 10)	1,5	1,2	1,5	1,5	1,0
Messung mit einem Polarographen (Sollwert)	1,55	1,23	1,64	1,66	1,11
% Abweichung der Messung v. Sollwert	3,2	2,4	8,5	9,6	9,9

3.4. Ergebnis

Alle Untersuchungen über pathologische Kupferspiegel im Urin brachten sehr gute Ergebnisse mit einer hohen Meßgenauigkeit. Die Handhabung des Meßsystems war dabei einfach und fehler-sicher.

4. Untersuchung pathologischer Kupferspiegel im Serum

4.1. Vorüberlegung und Vorbereitung

Die Messung von Cu-Konzentrationen im Blut sollte im Serum erfolgen, da üblicherweise hier der relevante Anteil bei einer Cu-Intoxikation oder eines Morbus Wilson gemessen und angegeben wird. Außerdem müßte bei einer Messung im Vollblut beim Veraschen mit mehr Störfaktoren durch mehr Säure gerechnet werden. Im Hinblick auf eine mögliche Anwendung des Meßsystems im klinischen Bereich wurde die kleinstmögliche untersuchbare Menge Serum von 5 ml zur Untersuchung bei einer Verdünnung von 1 : 10 gewählt. (siehe Diskussion S. 28 ff.) Dies entspricht einer Menge von 50 ml. Auf diese Weise stehen die für das Meßsystem benötigten 40 ml Untersuchungslösung ausreichend zur Verfügung.

Das Serum wurde durch Abzentrifugieren von Leichenblut gewonnen. Seren von Morbus Wilson Patienten standen nicht zur Verfügung.

4.2. Messung von Serumproben mit Werten entsprechend einer Kupferintoxikation

Die Aufstellung einer Meßreihe erfolgte im Prinzip wie in 3.2. Zu jeweils 5 ml Serum wurde eine vorher berechnete Menge Kupferstammlösung gegeben, anschließend wurde verascht, der Rückstand in Aqua-bi-dest aufgenommen und kurz aufgeköcht. Nach Einstellen des pH-Wertes mit konzentrierter NaOH auf den Wert von 8 wurde auf 50 ml aufgefüllt (Verdünnung 1 : 10), und es konnte gemessen werden. Der Ausgangswert der Probe wurde im physiologischen Bereich von 0,7 - 1,4 mg Cu/l (Literatur siehe S. 3) erwartet und als "Leerwert" definiert.

Die nachfolgende Tabelle 9 gibt die Ergebnisse der Messungen wieder.

Tabelle 9: Messung von Kupferkonzentrationen im Serum mit Kupferzusatz nach Veraschung

Cu mg/l erwarteter Wert	leer	0,05	0,07	0,1	0,12	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4
1. Meß- reihe	0,1	0,15	0,15	0,2	0,2	0,25	0,3	0,3	0,4	0,4
abzügl. Leerwert	0	0,05	0,05	0,1	0,1	0,15	0,2	0,2	0,3	0,3
2. Meß- reihe	0,1	0,15	0,2	0,2	0,25	0,25	0,3	0,4	0,4	0,4
abzügl. Leerwert	0	0,05	0,1	0,1	0,15	0,15	0,2	0,3	0,3	0,3
3. Meß- reihe	0,1	0,15	0,15	0,2	0,2	0,25	0,3	0,3	0,4	0,4
abzügl. Leerwert	0	0,05	0,05	0,1	0,1	0,15	0,2	0,2	0,3	0,3
4. Meß- reihe	0,1	0,15	0,15	0,2	0,2	0,25	0,3	0,3	0,4	0,4
abzügl. Leerwert	0	0,05	0,05	0,1	0,1	0,15	0,2	0,2	0,3	0,3

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, beträgt der gemessene Leerwert 0,1 mg Cu/l, was bei einem Verdünnungsfaktor von 10 einem tatsächlichen Wert von 1,0 mg Cu/l entspricht. Dies erklärt, daß die erwarteten Kupferkonzentrationen (eingekreiste Werte)

0,07 mg Cu/l

0,12 mg Cu/l

0,25 mg Cu/l

0,4 mg Cu/l

zunächst nicht dargestellt bzw. gemessen werden konnten.

Addiert man nämlich zu diesen den Leerwert 0,1 mg Cu/l, so ergeben sich die Werte

0,17 mg Cu/l

0,22 mg Cu/l

0,35 mg Cu/l

0,5 mg Cu/l,

die auf der Meßskala gar nicht vorhanden sind. Um nun alle Konzentrationen auf der Meßskala zu realisieren, mußten unter Berücksichtigung des Ausgangswertes der Probe für die obigen Werte die zugehörigen Mengen Kupferstammlösung berechnet und hinzupipettiert werden:

Leerwert = 0,1 mg Cu/l = 0,25 ml CuCl₂

Daraus folgt für eine Konzentration

von 0,07 mg Cu/l zusätzlich 0,075 ml CuCl₂

" 0,12 mg Cu/l " 0,05 ml CuCl₂

" 0,25 mg Cu/l " 0,375 ml CuCl₂

" 0,4 mg Cu/l " 0,75 ml CuCl₂

Nach weiteren 4 Meßreihen stimmten in allen Fällen die erwarteten mit den abgelesenen Werten überein. Die vorausgegangenen Meßreihen ließen mit hoher Wahrscheinlichkeit den Schluß zu, daß der mit dem halbquantitativen Meßsystem ermittelte Ausgangswert der Serumblindprobe auch tatsächlich 1,0 mg Cu/l betrug. Die polarographische Kontrollmessung bestätigte diesen Wert, sie ergab 1,01 mg Cu/l .

4.3. Ergebnis

Ebenso wie im Urin konnten im Serum nach Veraschung mit dem Meßsystem sehr gute Meßergebnisse erzielt werden.

G. DISKUSSION

Die nachfolgende Diskussion soll der Frage nach der Relevanz, der Praktikabilität und den Grenzen des geprüften Meßsystems in der klinischen Anwendung nachgehen.

Die Frage nach der Spezifität wird durch Tabelle 4 (S. 15/16) beantwortet. Es sind relativ hohe Konzentrationen von Störionen notwendig, um die Meßgenauigkeit zu beeinflussen. Somit verfügt das Meßsystem über eine hohe Spezifität.

Wie die vorangegangenen Versuche gezeigt haben, besitzt das untersuchte Meßsystem neben einer einfachen Handhabung zusätzlich eine sehr gute Präzision für wässrige Lösungen, Urin und Serum nach Veraschung und darüber hinaus eine sehr hohe Empfindlichkeit, was schon durch das Erfassen fast sämtlicher physiologischer Kupferspiegel im Urin und Serum, erst recht aber der pathologischen, dokumentiert wird. Lediglich ein physiologischer Kupferspiegel im Urin von 0,01 - 0,04 Cu mg/l kann nicht gemessen werden, was aber bedeutungslos ist, wenn man bedenkt, daß ein Kupferspiegel im Urin bis 0,12 mg/l noch normal ist und ein eindeutig pathologischer erst bei 1,0 mg/l anfängt. Auch die höchste physiologische Konzentration im Serum von 1,4 mg Cu/l läßt sich von der niedrigsten bei einer festgestellten Kupferintoxikation von 2,5 mg Cu/l eindeutig auseinanderhalten.

In der klinischen Anwendung müssen natürlich auch wesentlich höhere Kupferkonzentrationen, im Urin bis zu 65,7 mg/l und im Serum bis zu 23,5 mg/l, wie sie bei Intoxikationen vorkommen können (Literatur siehe Seite 7) in Betracht gezogen werden:

Liegt eine entsprechende Vergiftungssymptomatik vor, so muß dann nach der Veraschung eine Verdünnungsreihe hergestellt werden, in der die gesuchte Kupferkonzentration nicht übersehen werden kann. Damit Grenzfälle in der Messung von 0,05 mg Cu/l bzw. 0,4 mg Cu/l bei einzukalkulierenden Ablesefehlern sicher erfaßt werden, ist eine Verdünnungsreihe von jeweils 1 : 5 mit einer Ausgangsverdünnung von 1 : 10 die Methode der Wahl. Die erste Verdünnung mit dem Faktor 10 ist deshalb möglich, weil

selbst die niedrigsten in der Literatur beschriebenen Konzentrationen bei einer Kupfervergiftung (Serum: 2,5 mg Cu/l; Urin: 1,0 mg Cu/l) nicht aus dem Meßbereich herausfielen.

Zwei Beispiele für Grenzfälle bei Messungen im Urin und Serum sollen die Forderung nach der oben beschriebenen Verdünnungsreihe verdeutlichen. Sie wurden außerdem so gewählt, daß auch ein Potenzieren von Fehlern, die das abgestufte Meßsystem bei Mehrfachverdünnung zwangsläufig mit sich bringt, sichtbar wird:

Beispiel 1: Messung einer Kupferkonzentration im Urin.

Vorgegebene Konzentration: 55 mg Cu/l

Verascht: 5 ml Urin

		Verdünnung	Konzentration des mit Aqua-bi-dest aufgenommenen ver- aschten Urins - mg Cu/l	Meßwert (Abgelesener Wert) mg Cu/l
1. Verdün- nungsreihe	1. Messung	1 : 10	5,5	Ende d. Skala
	2. Messung	1 : 100	0,55	Ende d. Skala
	3. Messung	1 : 1000	0,055	0 oder 0,05
2. Verdün- nungsreihe	1. Messung	1 : 10	5,5	Ende d. Skala
	2. Messung	1 : 50	1,1	Ende d. Skala
	3. Messung	1 : 250	0,22	0,2 oder 0,25

Beispiel 1 zeigt, daß bei der ersten Verdünnungsreihe der gesuchte Wert falsch bestimmt werden kann. In der zweiten Verdünnungsreihe beträgt die hochgerechnete Konzentration entweder 50 mg Cu/l (bei einem Meßwert von 0,2 mg Cu/l) oder 62,5 mg Cu/l (bei einem Meßwert von 0,25 mg Cu/l).

Beispiel 2: Messung einer Kupferkonzentration im Serum.

Vorgegebene Konzentration: 4,3 mg Cu/l

Verascht: 5 ml Serum

		Verdünnung	Konzentration des mit Aqua-bi-dest aufgenommenen ver- aschten Urins - mg Cu/l	Meßwert (abgelesener Wert) mg Cu/l
1. Verdün- nungsreihe	1. Messung	1 : 10	0,43	Ende d. Skala
	2. Messung	1 : 100	0,043	0 oder 0,05
2. Verdün- nungsreihe	1. Messung	1 : 10	0,43	Ende d. Skala
	2. Messung	1 : 50	0,086	0,07 oder 0,1

Auch in Beispiel 2 kann bei der ersten Verdünnungsreihe die gesuchte Konzentration leicht falsch bestimmt werden. Die hochgerechneten Werte in der zweiten Verdünnungsreihe liegen bei 3,5 mg Cu/l (Meßwert 0,07 mg Cu/l) bzw. bei 5,0 mg Cu/l (Meßwert 0,1 mg Cu/l). Mit Hilfe der Beispiele 1 und 2 sowie der vorangegangenen Untersuchungen lassen sich nun Schlüsse zunächst für Messungen bei Kupferintoxikationen ziehen:

1. Das untersuchte Meßsystem ist eindeutig praktikabel,
 - a) da die Aufstellung der notwendigen Verdünnungsreihe einfach ist und
 - b) der Meßvorgang keine Probleme gezeigt hat.

Lediglich der Veraschungsvorgang von ca. 2 Stunden Dauer schränkt das Meßsystem hinsichtlich der Schnelligkeit geringfügig ein. Ebenso ist im allgemeinen ein Abzug erforderlich.

Es sei darauf hingewiesen, daß die Firma Merck zur Zeit ein Meßsystem für stark gefärbte Lösungen entwickelt. Es besteht die Möglichkeit, daß dann der Veraschungsvorgang entfällt und eine bloße Verdünnung ausreicht.

2. Zwar steigt mit zunehmender Kupferkonzentration die mögliche Fehlerbreite, doch ist dies aus folgenden Gründen bedeutungslos:

- a) Es besteht therapeutisch kein Unterschied, ob bei einer Kupferintoxikation die Kupferkonzentration im Urin nun 50 mg/l, 55 mg/l oder 62,5 mg/l beträgt (Beispiel 1) bzw. im Serum 3,5 mg/l, 4,3 mg/l oder 5,0 mg/l (Beispiel 2).
- b) Es existiert ein weiteres Meßsystem von MERCK für Kupfer, das nach dem gleichen Prinzip arbeitet, jedoch in einem Konzentrationsbereich von 0,25 - 5 mg Cu/l. Bei zusätzlichem Einsatz auch dieses Systems könnten dann hohe Konzentrationen noch genauer halbquantitativ bestimmt und die Menge der Untersuchungslösung verringert werden.

Neben der Diagnose einer Kupferintoxikation (-exposition) anhand der Kupferkonzentrationen im Serum und Urin kann mit dem untersuchten Meßsystem noch einfacher die Diagnose eines Morbus Wilson gesichert werden (siehe Seite 9 und 23). In der Literatur werden hier im Urin Kupferkonzentrationen von 1 - 3 mg/l angegeben. Um in den Meßbereich des vorliegenden Systems zu kommen, würde schon eine einmalige Verdünnung von 1 : 10 genügen.

Wird im Zuge einer Diagnosesicherung eines Morbus Wilson zusätzlich Serum untersucht, müßte die Konzentration weniger als 0,8 mg Cu/l betragen. Dies macht den Einsatz von 10 ml Serum und einer einmaligen Verdünnung von 1 : 5 notwendig, um einerseits genau in den Meßbereich des Verfahrens zu gelangen und andererseits die erforderliche Menge von 40 ml Meßlösung zu erhalten.

Wie schon unter D.2. erwähnt, ist ein niedriger Serumkupferspiegel allein noch nicht für einen Morbus Wilson beweisend. Hinzukommen muß ein erhöhter Kupferspiegel im Harn, der wie unter F.3.3. beschrieben, mit dem vorgestellten Verfahren sicher meßbar ist. So kann z. B. bei einem Patienten, der Symptome einer Hepatitis unklarer Genese zeigt und der nicht kupferexponiert ist, ein Morbus Wilson bestätigt oder ausgeschlossen werden.

Damit stellt sich nun die Frage, wo soll und wo kann das untersuchte Meßsystem Aquaquant überhaupt eingesetzt werden?

Wie schon in der Einleitung dargelegt, kommen all diejenigen Kliniken und Institute in Frage, die sich aus finanziellen und personellen Gründen aufwendige Meßapparaturen nicht leisten können. Zwar gibt es eine photometrische Methode für das klinisch-chemische Labor zur Kupferbestimmung im Serum, jedoch ist dieses Verfahren im Vergleich relativ kompliziert.

Auch in der Arbeitsmedizin könnte Aquaquant verwendet werden. In der Gerichtsmedizin ist die Relevanz gering, da solche Institute meist über hochwertige Meßapparate wie z. B. Polarographen, Spektrographen und Atomabsorptionsspektrographen verfügen und für die postmortale Differentialdiagnose eines Morbus Wilson oder einer Kupferintoxikation zusätzlich Organmaterial (besonders Gehirn: WINKLER und ARDEN, 1963; REED et al., 1972; LEU et al., 1971) notwendig ist, da im Serum durch Hämolyse erhöhte Kupferwerte entstehen können (ROCHE-SICOT, BUCHAMON, 1977).

Es sei abschließend darauf hingewiesen, daß noch weitere Stoffe wie Ammonium, Cyanid, Eisen, Mangan, Nickel, Nitrit, Sulfid, Zink und Chromat mit dem Aquaquant Schnelltestprogramm bestimmt werden können. Die von GELDMACHER - v. MALLINCKRODT initiierte Gesamtuntersuchung dieses Programmes dürfte demnach für klinisch-toxikologische Fragen vielversprechend sein, insbesondere wenn man daran denkt, daß jede Gemeinde ein Wasserwerk mit entsprechender Ausrüstung besitzt und somit das gesamte Aquaquant Schnelltestprogramm für jede kleinere Klinik verfügbar wäre.

Ebenso wäre eine gewerbetoxikologische Anwendung denkbar, und ein Einsatz des Testprogramms hierfür müßte noch geprüft werden.

H. LITERATURVERZEICHNIS

1. BRANDT, G.
Ikterus und Schlangenbiß - Hämolytische Krise und
Frühmanifestation des M. Wilson
Therapiewoche 25, 5222 - 5224 (1975)
2. BRANDT, G.
Möglichkeiten und Grenzen der Diagnose Kupfer-
speicherkrankheit aus Biopsiematerial der Leber
Beitr. pathol. Anat. 152, 151-162 (1974)
3. BUDDECKE, E.
Grundriß der Biochemie
De Gruyter, Berlin - New York, 1977
4. BUSH, J.A.; MAHONEY, J.P.; MARKOWITZ, H.;
GUBLER, C.J.; CARTWRIGHT, G.E. and WINTROBE, M.M.
Studies on copper-metabolism
J Clin Invest, 34, 1766 - 1772 (1955)
5. CARTWRIGHT, G.E. and WINTROBE, M.M.
Copper metabolism in normal subjects
Amer J clin Nutr 14, 224 - 232 (1964)
6. CHUTTANI, H.K.; GUPTA, P.S. and GULATI, S.
Acute copper - sulfate poisoning
Amer J Med, 39, 849 - 854 (1965)
7. CROSS, J.D.; LESLIE, C.D. and SMITH, H.
Copper levels in human tissue
J Forens Sci Soc 16, 311 - 315 (1976)

8. EDER, M. und GEDIGK, P.
Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der
Pathologischen Anatomie
Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1977
9. FAZEKAS, I.G.
Tödliche Kupfersulfatvergiftung nach dem
Genuß besprengter Weintrauben
Acta Med Leg Soc XVII, 129 - 138 (1964)
10. GELDMACHER - V. MALLINGKRODT, M.; KITTEL, H.
und OPITZ, O.
Akute tödliche Vergiftung mit Kupferoxychlorid
Arch Kriminol 143, 127 - 137 (1969)
11. GROSS, R. und SCHÖLMERICH, P.
Lehrbuch der Inneren Medizin
Schattauer; Stuttgart - New York, 1977
12. HEGGLIN, R.
Differentialdiagnose Innerer Krankheiten
Thieme, Stuttgart, 1972
13. HENSCHLER, D.
Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikolo-
gisch-arbeitsmedizinische Begründung von
MAK-Werten
Chemie, Weinheim/Burgstr., 1979
14. HOLTZMANN, N.A.; ELLIOTT, D.A. and HELLER, R.H.
Copper intoxication. Report of a case with
observations on ceruloplasmin
New Engl J Med 275, 347 - 352 (1966)

15. HORNBOSTEL, H.; KAUFMANN, W. und SIEGENTHALER, W.
Innere Medizin in Praxis und Klinik, Band IV
Thieme, Stuttgart (1978)
16. JOEST, W.
Kupfervergiftung nach Injektion von Kupfersulfat in
eine tuberkulöse Fistel
Sammlung von Vergiftungsfällen 8 A 683, 99 (1937)
17. KLEIN, W.J.; METZ, E.N. and PRICE, A.R.
Acute copper intoxication, a hazard of
hemodialysis
Arch Intern Med 129, 578 - 582 (1972)
18. LUDEWIG R. und LOHS, K.H.
Akute Vergiftungen
Fischer; Jena, 247 - 249 (1974)
19. LEU, M.L.; STRICKLAND, G.T. and YEK, S.J.
Tissue copper, zinc and manganese levels
in Wilson's disease:
Studies with the use of neutron activation
analysis
J Lab Clin Med 77, 438 - 444 (1971)
20. MERET, S. and HENKLIN, R.J.
Simultaneous direct estimation by AAS of
copper and zinc in serum, wine and
cerebrospinal fluid
Clin Chem 17, 369 - 373 (1971)
21. MOESCHLIN, S.
Klinik und Therapie der Vergiftungen
Thieme, Stuttgart - New York, 140 - 142 (1980)

22. PIPER, W.
Innere Medizin
Springer, Berlin - Heidelberg - New York (1974)
23. PSCHYREMBEL, W.
Klinisches Wörterbuch
De Gruyter, Berlin - New York (1975)
24. REED, G.B.; BUTT, E.M. and LANDING, B.H.
Copper in childhood liver disease
Arch Pathol 93, 249 - 255 (1972)
25. ROCHE - SIGOT, J. and BENHAMON, J.P.
Acute intravascular hemolysis and acute liver
failure associated as a first manifestation
of Wilson's disease
Amer Int Med 86, 301 - 303 (1977)
26. SCHETTLER, G.
Innere Medizin
Thieme, Stuttgart - New York (1980)
27. VALLEE, B.L.
Copper, Air Quality Monographs
Amer Petrol Instit, Washington D.C., USA 1975
28. VOSSCHULTE, K.; LASCH, H.G. und HEINRICH, F.
Innere Medizin und Chirurgie
Thieme, Stuttgart, 658 - 659, 1979
29. WINKLER, F. und ARDEN, S.
Über den Kupfergehalt menschlicher Organe
bei verschiedenen Krankheitszuständen
Klin WSchr 41, 509 - 517 (1963)

30. ZÖBER, A.; GELDMACHER - V. MALLINCKRODT, M.;
SCHELLMANN, B.

Akute tödliche Kupfervergiftung

Kasuistik und Überlegungen zur Differentialdiagnose

Arch Toxicol 40, 263 - 267 (1978)

An dieser Stelle danke ich Frau Professor Dr. Dr. M. Geldmacher - v. Mallinckrodt für die Überlassung des Themas, für ihre immer freundliche, sehr hilfsbereite Unterstützung und die außergewöhnlich großzügige Verwendung ihrer knapp bemessenen Zeit.

Herrn Professor Dr. H.-B. Wuermeling, Direktor des Institutes für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg, bin ich für die Übernahme des Korreferates zu Dank verpflichtet.

I. LEBENSLAUF

Personalien:

Björn Schmorell,
geb. am 22. Juli 1953 in Düsseldorf,
Staatsangehörigkeit: deutsch,
Eltern: Georg Schmorell, Arzt,
Ilse Schmorell, geb. Kühnen,
Krankengymnastin.

Ausbildung:

1960 - 1964 Volksschule in Düsseldorf
1960 - 1972 Leibniz-Gymnasium in Düsseldorf
1972 Abitur
1972 - 1973 Studium der Physik und Chemie in
 Bochum
1973 - 1974 Wehrdienst in Hamminkeln
1974 - 1976 Studium der Wirtschaftswissenschaften in Dortmund (Vordiplom)
1976 - 1982 Studium der Humanmedizin an der
 Universität Erlangen-Nürnberg
22.3.1978 Physikum
22.3.1979 1. Ärztliche Prüfung
21.8.1981 2. Ärztliche Prüfung
5.10.1982 3. Ärztliche Prüfung

